

高輝度放射光 X 線による昆虫の高速羽ばたき機構の解明

岩本裕之

公益財団法人高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

八木直人

公益財団法人高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

要旨 高輝度放射光 X 線を用い、ときに毎秒1000回に及ぶ昆虫の高速羽ばたきを可能にする飛翔筋動作の分子機構を追求した研究の成果について解説する。

1. はじめに

現在、放射光 X 線は生命科学の構造解析研究にとって欠かせないツールとなっている。最もポピュラーな蛋白質結晶構造解析では原子分解能の3次元構造決定が可能である。一方、結晶化していない生体分子やその集合体に X 線を照射し、その散乱を記録解析する非結晶構造解析法は、通常空間分解能は結晶構造解析に劣るが、生体分子をより生体内（細胞内）に近い環境に置いて測定できる、また構造変化の時間経過を追跡できる等のメリットがある。場合によっては生きた細胞や生物個体内で機能している生体分子の構造を非侵襲的に観察することも可能である。このトピックスでは、生きた生物内の生体分子への非結晶構造解析法の応用と、それに高輝度のシンクロトロン放射光 X 線を組み合わせるときに何ができるかということを実例を挙げて解説したい。

ここで解説する測定の対象は、昆虫の飛翔筋である。よく知られるように、昆虫は地球上で最も種類数の多い動物群であるが、その繁栄の秘密の一つがその飛翔能力にあることは間違いない。昆虫の羽ばたきは一般に大型種では遅く、1秒に20-30回程度であることが知られるが、超小型種では1秒に1000回に及ぶことがある。この羽の動きを担っているのが、昆虫の胸部にある飛翔筋である。昆虫の体は頭部、胸部、腹部の3つの部分に分かれ、胸部には4枚の羽と6本の足が生えているが、飛ぶ昆虫では飛翔筋が胸部の体積の大部分を占めていることが多い。そして、ときに毎秒1000回に及ぶ¹⁾羽ばたきを担う飛翔筋には、高速羽ばたきを可能にする特殊な機能が備わっているのだが、長年の研究にもかかわらず、その分子機構は不明のままだった。ここで紹介する研究は、その分子機構を解明する目的で行われた。

2. 筋肉の構造と機能

昆虫飛翔筋の機能の特殊性を説明するには、まず筋肉一般の構造と機能を解説しておく必要がある。**Fig. 1**は脊椎動物骨格筋の構造の模式図である。1つの筋肉は直径100-200マイクロメートル程度の多数の筋細胞（筋線維）が集まってできている。筋細胞の中には直径1-2マイクロメートルの筋原繊維がぎっしり詰まっている。1本の筋原繊維は筋節（サルコメア）と呼ばれる長さ2-3マイクロメートルの繰り返し単位が直列に多数つながってできたものである。筋節は筋収縮機能の最小単位であり、この中で収縮タンパクであるミオシンが重合してできたミオシン繊維と、同じくアクチンが重合してできたアクチン繊維が互いに滑りあうことで収縮張力の発生が起こる。ミオシン分子は球状の頭部と、細長い尾部の2つの部分からなる。尾部は互いに重合してミオシン繊維の骨組みをつくる。頭部にはアクチン結合部位と ATP 加水分解部位があり、ATP を加水分解する際に遊離される化学エネルギーを取

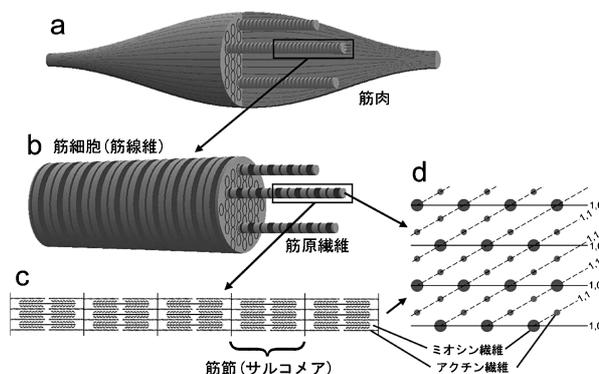


Fig. 1 Schematic diagram of the structure of vertebrate skeletal muscle. Taken from SPring-8 home page.

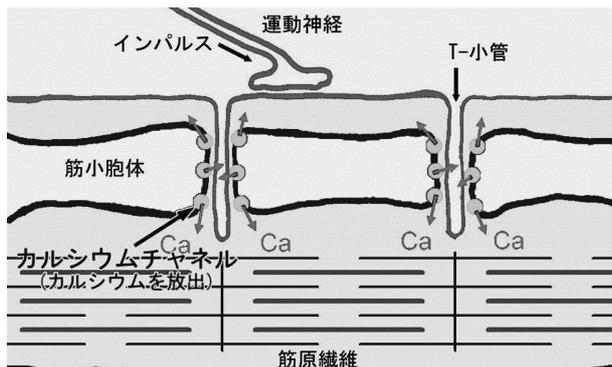


Fig. 2 Excitation-contraction coupling of vertebrate skeletal muscle.

縮の力学エネルギーに変換する。

また筋肉は必要に応じて収縮・弛緩しなければいけないので、これを制御する仕組みが必要である。Fig. 2 にその仕組みを解説する。脊椎動物骨格筋の場合、収縮するときはまず中枢からのインパルス（細胞膜興奮）が運動神経を通じて伝播されてくる。このインパルスは神経筋接合部を介して筋細胞に伝えられ、筋細胞膜自身の興奮が起こる。この興奮はさらに細胞膜から陥入するT小管によって筋細胞内部に伝えられ、これに隣接する筋小胞体（カルシウムイオンを貯蔵する小胞）からのカルシウムイオンの放出をもたらす。放出されたカルシウムイオンが、アクチン繊維上にある収縮調節タンパクであるトロポニンに結合することでアクチンとミオシンの相互作用が始まり、筋収縮が開始するのである。筋が弛緩しているときには、もう1つの収縮調節タンパクであるトロポミオシンが、アクチンのミオシン結合部位を覆ってブロックしているため、ミオシンはアクチンに結合することができない。しかしトロポニンにカルシウムイオンが結合すると、トロポミオシンが移動してアクチンのミオシン結合部位が露出するため、ミオシンとアクチンの相互作用が可能になるのである。

また弛緩するときは、筋小胞体の膜上にあるカルシウムポンプ（カルシウム輸送タンパク）によって細胞質中のカルシウムイオンが筋小胞体に汲み上げられる。この輸送は濃度勾配に逆らって行われるので、エネルギー（ATP）を必要とする能動輸送である。ATP を供給しているのは、同じく筋細胞内にあるミトコンドリアという細胞小器官である。

収縮弛緩の調節の機構は筋肉の種類によって異なる。しかし昆虫飛翔筋は脊椎動物と同様に横紋筋の構造をもち、収縮弛緩の調節もトロポニン・トロポミオシン系を介するので、脊椎動物横紋筋に非常に似ていると言える。

3. 昆虫飛翔筋の機能の特殊性

前に述べたように、昆虫飛翔筋の特徴はその動作の周波

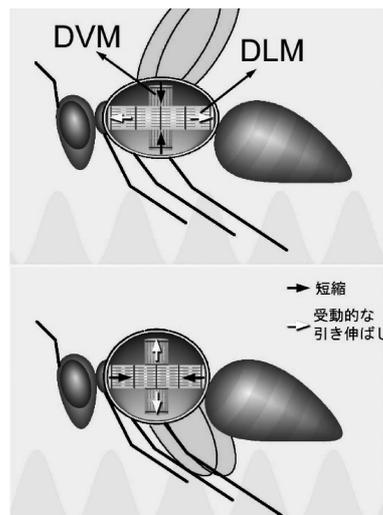


Fig. 3 Mechanism of action of indirect flight muscle and stretch activation. Taken from SPring-8 home page.

数の高さである。現在地球上にいる昆虫の多くは数ミリ以下と非常に小型であり、空力学的な理由で小型の昆虫が十分な揚力を得るためには高い周波数で羽ばたく必要がある。ときに毎秒1000回に及ぶ収縮弛緩を脊椎動物骨格筋のようなカルシウムイオンの放出・再取り込によって制御するのは事実上不可能と断言している。その理由は、カルシウム再取り込みの頻度が上がることでATPの消費が増えるため、ミトコンドリアの体積を大きくしなければならず、肝心の筋原繊維のための体積が減ってしまうからである。

そこで、ハチやハエなどの進化した昆虫では振動ごとにカルシウムを放出・再取り込みするのをやめ、低い神経インパルス頻度で細胞内カルシウム濃度を一定に保ったうえ筋原繊維が自励振動するようになっている²⁾。この方式ではカルシウムの再取り込みに伴うATP消費を抑えられるため、ミトコンドリアの生産するATPを有効に筋原繊維に振り分けることができる。それでもハチの飛翔筋ではミトコンドリアが筋細胞の体積の50%を占めている³⁾。これは高速で自励振動する筋原繊維のATP消費そのものが高いためである。

この高速の自励振動を可能にするのは、「伸長による活性化」(Stretch activation) という仕組みである。これは筋肉が外力によって受動的に引き伸ばされたとき、遅れて大きな力を発生する性質のことである。トンボなど一部を除き、大部分の昆虫の飛翔筋は「間接飛翔筋」と呼ばれる方式をとっている。これは飛翔筋が羽を直接動かすのではなく、飛翔筋の入っている胸部の外骨格を変形させることで間接的に羽を動かす方式である。これらの昆虫には2対の飛翔筋があり、一方が収縮すると他方が引き伸ばされる拮抗関係にある。これらは胸部の背中側を前後方向に走るDorsal longitudinal muscle (DLM) と、背腹方向に走る

Dorso-ventral muscle (DVM) である。これらの一方が短縮すると、引き伸ばされたもう一方は上に述べた「伸長による活性化」によって大きな力を出し、相手を引っ張り返す。こうして互いに引っ張り合うことで羽ばたきを継続できる (Fig. 3)。

このように「伸長による活性化」は持続的な羽ばたきに不可欠の機能であるが、これが分子レベルでどのような仕組みで起こるのか、昆虫飛翔筋にしかない特殊な機能なのかについては、長年の研究にかかわらず不明のままだった。以下にこの問題に対する、高輝度放射光 X 線を用いた我々のアプローチについて解説する。

4. 伸長による活性化に関する従来の説

ここで、筋肉を構成しているアクチン繊維・ミオシン繊維 (Fig. 1) の構造について更に詳しく説明する。両者とも収縮タンパクがらせん状に重合したものである。アクチン繊維は動物や筋肉の種類によらず基本的に同一の構造で、モノマーのピッチが約 2.75 nm、周期 5.1 nm または 5.9 nm の 1 重らせん、あるいは周期 38.7 nm の 2 重らせんとして捉えることができる。ミオシン繊維の構造は動物種によって異なるが、昆虫飛翔筋の場合はモノマーのピッチが 14.5 nm、周期 116 nm の 4 重らせんである⁴⁾。この 116 nm の周期は、アクチンの長周期 38.7 nm のちょうど 3 倍になっている。

また前に述べた収縮調節タンパクのトロポニンも 38.7 nm ごとに 1 対存在している。アクチン繊維はそのらせん構造のため、ミオシン分子が結合しやすい向き (ミオシンの方を向いた) アクチンモノマーは限られている。トロポニンの存在する領域ではアクチンモノマーはミオシンの結合に不適な向きであり、好適な向きのアクチンモノマーは隣り合ったトロポニンの中間付近の領域にある (この領域をターゲットゾーンという)。したがってトロポニンもターゲットゾーンも 38.7 nm の周期で存在している。

1 本のミオシン繊維の周りを 6 本のアクチン繊維が囲んでいるが、隣り合ったアクチン繊維間ではトロポニンまたはターゲットゾーンの位置が 38.7 nm 周期の 1/3、すなわち 12.9 nm ずれている。したがって 1 本のミオシン繊維を中心として見たとき、トロポニンまたはターゲットゾーンは基本周期 38.7 nm の 2 重らせんの形に並ぶことになる⁴⁾。

ミオシン繊維、アクチン繊維の配列が上記のようであるとき、ある長さではミオシンの位置とターゲットゾーンの位置は完全にずれてしまっており、長さを 38.7 nm の半周期分だけ引っ張ってやるとミオシンの位置とターゲットゾーンの位置がよく一致するようになる (Fig. 4)。これが「伸長による活性化」の機構だというのが Wray⁵⁾ の提唱したいわゆるマッチ-ミスマッチ仮説である。この考えでは、「伸長による活性化」が起こるかどうかは純粋にアクチン分子、ミオシン分子の位置関係だけで決まる。この仮

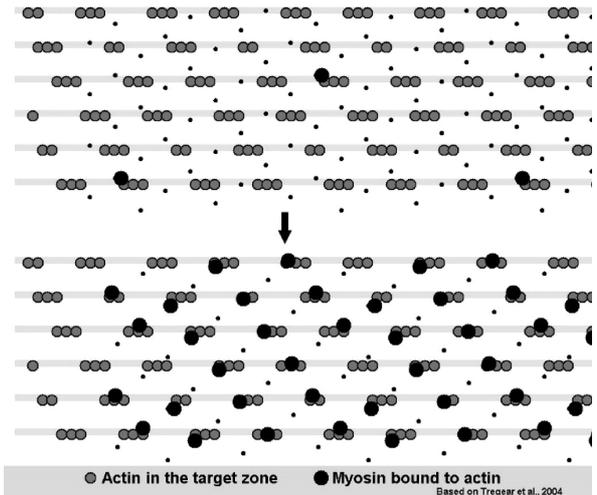


Fig. 4 Match-mismatch hypothesis of stretch activation, showing 6 actin filaments surrounding one myosin filament. The gray circles represent actin monomers in the target zone. Small dots represent the positions of myosin heads, and the large black circles are the myosin heads that are close enough to the target zone and can interact with actin.

説の問題点は、この機構が有効に働くためにはミオシン繊維の回転角が全て揃っている必要があるということであり、もし揃っていなければミオシン分子とターゲットゾーンの位置が一致する確率は平均化されてしまう。

Wray の古典的な仮説に対し、最近注目を浴びたのが「調節タンパク仮説」とも呼べるものである。すなわちトロポニン、トロポミオシンが「伸長による活性化」に対して重要な役割を果たすという考えである。この仮説を提唱する発端になったのは Agianian ら⁶⁾ の研究結果である。トロポニンのサブユニットの 1 つ、トロポニン C はカルシウム受容タンパクであるが、昆虫飛翔筋 (タガメ) には 2 種類のアイソフォーム (同種のタンパクだがアミノ酸配列が異なるもの) が発現しているという。これらを F1、F2 と呼ぶが、80% を占める F1 からはカルシウム結合部位が消失してしまっている。一方 F2 は通常のコロポニン C である。そこで飛翔筋のコロポニン C を全て F1 で置き換えたところ顕著な「伸長による活性化」がみられたが、全てを F2 で置き換えたところ脊椎動物骨格筋のような持続的な張力発生はするものの「伸長による活性化」はみられなくなったという。このことから Agianian ら⁶⁾ は、飛翔筋のコロポニンはカルシウムの代わりに機械的な伸長シグナルを検知して筋肉を活性化するのだという説を提唱した。

しかしトロポニン C は「EF ハンドタンパク」というごく一般的な 2 価イオン結合タンパクの一種であり、これが機械的シグナルを検知するとは考えにくい。また伸長はミオシン繊維・アクチン繊維の相対的な滑りであるから、トロポニンが伸長を検知するためにはミオシン繊維の相対的な位置変化をトロポニンに伝える構造が必要である。こ

れについて言えば、トロポニンのもう一つのサブユニットであるトロポニン I も飛翔筋のものは特殊であり、末端にアミノ酸のアラニンとプロリンを多く含む非常に長い延長部があり、これがミオシン繊維に届くのに十分な長さがある。そこで同じ著者らは、この延長部がトロポニンに伸長のシグナルを伝えるのだという考えを提唱した⁷⁾。

この他にミオシン頭部がアクチンでなくトロポニンに触れていて、これが伸長シグナルを伝えるか、または直接にトロポミオシンを動かすという考えも提唱されている⁸⁾。

5. 調節タンパク仮説の検証

筆者らは、まず調節タンパク仮説、特にトロポニン I の長い延長部の「伸長による活性化」に対する役割について検証することにした。この長い延長部が伸長シグナルを伝えるのなら、これを切断してしまえば「伸長による活性化」は消失すると予想される。そこである特定のアミノ酸配列の部位だけを切断し、他のタンパクには影響を与えない特異的なタンパク分解酵素を使用し、トロポニン I の延長部をほぼ完全に除去した。

結果は、延長部を除去した後も「伸長による活性化」は正常にみられた。このことから延長部が伸長シグナルを伝えるという説は完全に否定されてしまった⁹⁾。それではこの延長部の役割は一体何なのだろうか？ X 線回折像を記録すると、この延長部の除去後に興味深い変化が起こることが明らかになった。アクチン・ミオシン繊維の 6 角格子の配列に由来するブラッグ反射である赤道反射は、脊椎動物骨格筋では 1,1 反射が強く 2,0 反射は弱いのにに対し、昆虫飛翔筋では 2,0 反射が圧倒的に強く 1,1 反射は弱い。これは 6 角格子の構造が脊椎動物と昆虫で異なるためである。脊椎動物では 3 本のミオシン繊維が作る正三角形の重心位置に 1 本のアクチン繊維がある。それに対し、昆虫では隣り合った 2 本のミオシン繊維の midpoint に 1 本のアクチン繊維がある (Fig. 5)。この配列の違いにより繊維の数も異なり、脊椎動物の場合ミオシン繊維 1 本に対しアクチン繊維 2 本の割合であるが、昆虫の場合はミオシン繊維 1 本に対しアクチン繊維 3 本である。

昆虫飛翔筋の X 線回折像では 1,1 と 2,0 の反射強度比は収縮弛緩等の条件を変えても殆ど変化しないが、トロポニン I の延長部を切断すると弛緩条件において 2,0 の強度が激減し、2 つの反射の強度がほぼ同じになってしまう。さらに興味深いことに、この筋繊維を活性化して収縮状態にすると、2,0 の強度が復活して正常の赤道反射の強度プロファイルに戻るのである¹⁰⁾ (Fig. 6)。これは筋繊維の超薄切片の電子顕微鏡観察の結果、弛緩状態ではかなりのアクチン繊維が脊椎動物の位置 (正三角形の重心) に移動しているためであることが判明した。すなわちトロポニン I の延長部は、アクチン繊維を正しく昆虫の位置 (2 本のミオシン繊維の midpoint) に保つ役割があるらしい。収縮中はミ

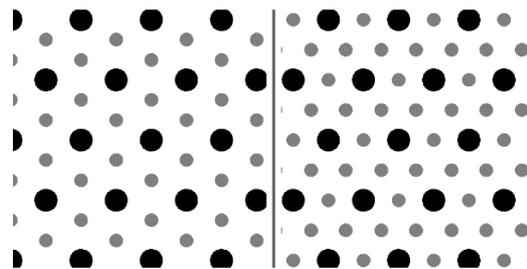


Fig. 5 Filament lattice structure of vertebrate skeletal muscle and insect flight muscle. Left, vertebrate skeletal muscle; right, insect flight muscle. The black and gray circles represent the myosin and the actin filaments, respectively.

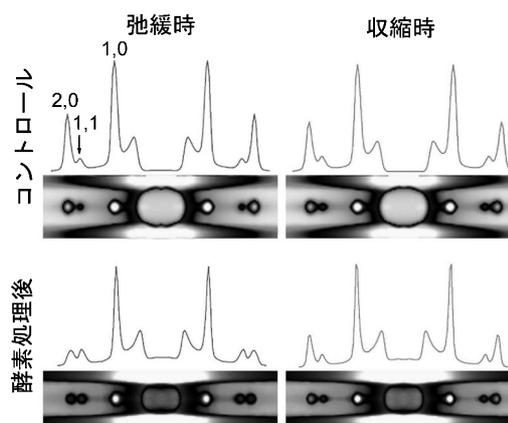


Fig. 6 Effect of removal of troponin-I extension on the intensity profiles of equatorial reflections in bumblebee flight muscle. Taken from ref. 10.

オシン頭部自身がその役割を担うため、昆虫の配列に戻るであろう。実験室レベルでは機能への影響は少なかったが、生きた昆虫が長時間羽ばたく際には繊維の配列の不安定性は悪影響を及ぼす可能性がある。その他に、この延長部が他のタンパクを結合させる足場として機能しているという報告もある¹¹⁾。

6. 何が伸長シグナルを検知するか

以上から、トロポニンがトロポニン I の延長部を介して伸長シグナルを受容する可能性はなくなった。ミオシンが直接トロポニンに触れる説は否定されてはいないが、これを証明するには昆虫ミオシンが実際に昆虫トロポニンに対して親和性がある、または結合部位があることを示す必要があるが、現在それを示す実験的証拠はない。

トロポニンでないとするれば、一体何が伸長シグナルを検知して「伸長による活性化」を引き起こしているのだろうか？ これを調べるため、さらに X 線回折実験を行った。

飛翔筋の研究では、主に昆虫の体から単離し、細胞膜を取り除いた脱膜標本 (スキンドファイバー) を用いる。こ

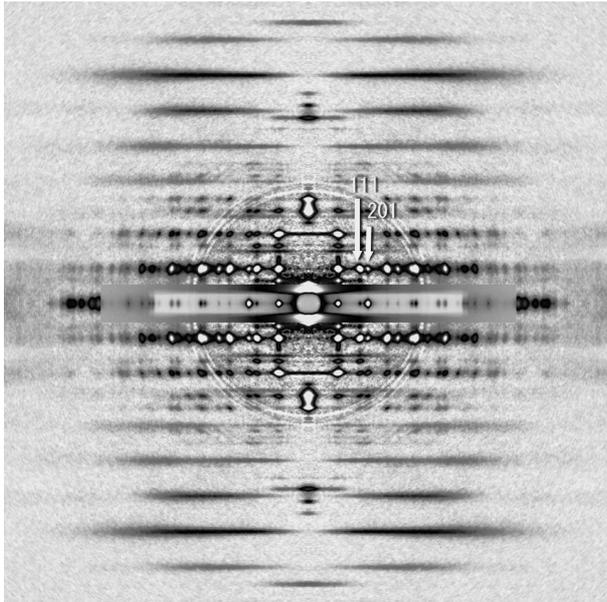


Fig. 7 X-ray diffraction pattern from demembrated insect flight muscle (giant waterbug), showing the positions of the 111 and 201 reflections.

の状態にしても「伸長による活性化」は起きるので、細胞膜の興奮などは伸長による活性化に関与していないのは確かである。脱膜標本では収縮タンパクの溶液環境を自在に変えることができ、また張力測定や精密な長さ変化を加えることも容易である。また高画質のX線回折像を記録することもできる。この試料を用い、急速に伸長したときに回折像中に最初に起こる変化を記録することにした。最初に起こる変化は、「伸長による活性化」の引き金となる構造変化を反映している可能性が高いからである。

マルハナバチ飛翔筋の脱膜標本を用い、これをカルシウムイオンで活性化したのち、1 ms で完了するステップ伸長を加え、そのときの回折像変化を0.5 ms の時間分解能で測定した¹²⁾。そのとき最も早く伸長に反応したのは111, 201の2つの反射であった (Fig. 7. 38.7 nm を軸方向の基本周期としたときのミラー指数)。伸長とほぼ同時に111反射は増強し、201は弱くなった。この変化は数msのうちに減衰した。これらの反射はいずれもアクチン第1層線反射 (38.7 nm を基本周期とするアクチンのらせん配列に由来) 上の反射であるが、その変化は「伸長による活性化」による発生張力と同様、カルシウム濃度とともに増大すること、また同じ層線反射上にある他の反射スポットとは明確に挙動が異なることから、「伸長による活性化」の引き金になる構造変化を特異的に反映している可能性が高いと考えられた。

しかし脱膜標本はあくまでも人工的な標本であり、この観察が真に「伸長による活性化」と関係があるなら生きて羽ばたいている昆虫の飛翔筋にも同じ現象が起きているはずである。そこで、それを確認するため、生きたマルハナ

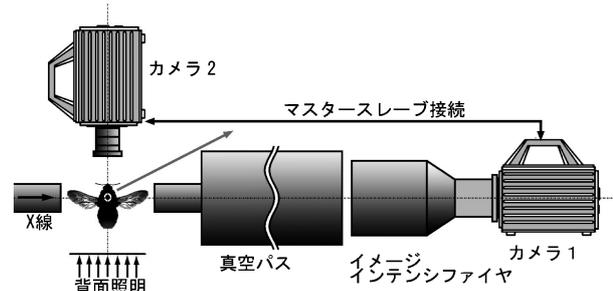


Fig. 8 Setup for recording fast X-ray movies from the flight muscles from live bumblebees while beating. Taken from ref. 13.

バチが羽ばたいているときに飛翔筋にX線を照射し、羽ばたきのタイミングによって回折像がどのように変化しているかを調べることにした。

上記の脱膜標本の実験は室温 (20°C) で行われ、記録したX線回折像ムービーは2,000コマ/秒であった。しかし羽ばたいているマルハナバチの飛翔筋の温度は脊椎動物のタンパクなら失活するような42°Cという高温に保たれており、それに応じて収縮タンパクの動きも速くなる。したがって生きたマルハナバチを用いた測定の際には5,000コマ/秒の高速撮影を行った¹³⁾。

Fig. 8 は SPring-8 の高輝度ビームライン・BL40XU にて測定を行ったときのセットアップを示す。基本的に小角散乱のセットアップであり、試料の3.3 m 下流に真空パスを介して検出器を置いた。マルハナバチは飛翔筋のある胸部の上側に接着したアルミ管によって保持し、一定位置にX線ビームが照射できるようにした。ビームは2種の拮抗する飛翔筋 (DLM・DVM) の交わる箇所照射し、これらの筋肉からの回折像が同時に記録できるようにした。昆虫の足は何にも触れていない状態で、昆虫は自分が空中にあるものと思い羽ばたく (tethered flight という手法) と言われているが、実際に羽ばたかせるには更に工夫が必要であった。X線のエネルギーは15 keV とやや高めにし、昆虫の厚い胸部を十分透過できるようにした。

検出器は短残光性蛍光体 P46を備えた浜松ホトニクス社製6インチイメージンシファイヤ VP5445に、フォトン社製高速 CMOS ビデオカメラ SA-X (モノクロ) を組み合わせて用いた。画素数は1024×1024ピクセルである。またこれとは別にもう1台の高速ビデオカメラ (同じくフォトン社製 SA-5) を、羽ばたき中のハチの姿そのものを記録するために用いた。これら2台のカメラはマスタースレーブ接続にして同一のクロック信号で駆動したため、X線ムービーのフレームを羽ばたきの周期と完全に1対1対応させることが可能であった。

Fig. 9 は正面から記録したハチの羽ばたきのムービーの1コマで、円はソフトウェアにより自動認識された羽の位置である。羽が最も高い位置にきた瞬間を位相0度としてフェーシングを行った。Fig. 10 は1匹のハチから記録さ

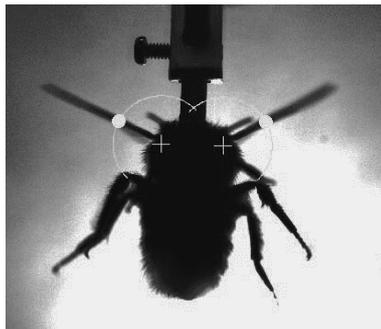


Fig. 9 One of the movie frames showing the wing-beat of a bumblebee, recorded from its front. Taken from ref. 13.

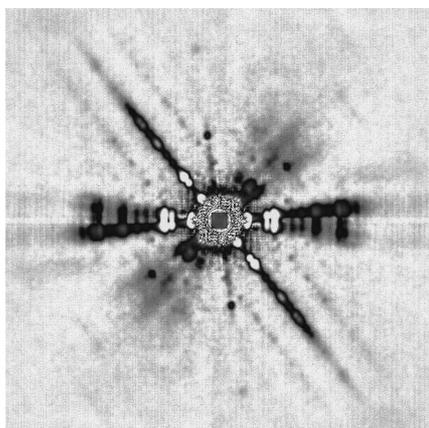


Fig. 10 One of the X-ray diffraction movie frames recorded from a single bee. Taken from ref. 13.

れた X 線ムービーの 1 コマであり、DLM と DVM の回折像が重なって記録されている。画像の中心（ビーム位置）から伸びる強い反射は赤道反射で、水平に近いものが DLM 由来、それと約 60 度の角度で交わるのが DVM 由来である。筋細胞の長軸は赤道反射と垂直の方向である。生きた昆虫の場合、回折像は筋肉以外の組織や外骨格等からの散乱を含むため、脱膜標本と比較してバックグラウンドが綺麗ではないが止むを得ないことである。実際のムービーを見ると各反射の強度が羽ばたきにつれて変動し、また反射の現れる方向（筋細胞の軸の方向を反映）も揺らいでいるのが分かる（本論文¹³⁾のサプリメントを参照）が、各反射を同定するのはこのムービーではやや困難である。

そこで、Fig. 11 では使用した 9 匹のハチからの回折像を全て加算してムービーを作成しているが、その際に DLM の赤道反射が水平になるように回折像を回転させてから加算を行っている。こうすることで脱膜標本からの回折像と対応させることが容易になり、それぞれの反射を確実に同定できる。また DLM と DVM の交わる角度は X 線照射部位によって異なるため、このような加算のしかたをすると DVM 由来の反射はぼけるので都合がよい（DVM について同様の加算を行った画像は本論文に掲載されてい

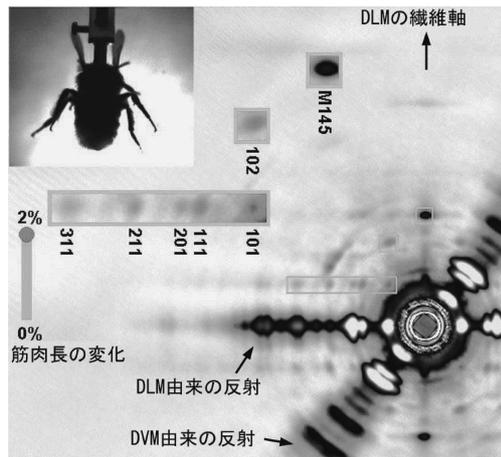


Fig. 11 One of the X-ray diffraction movie frames made by summing data from 9 bees and re-orienting so that the equator for DLM is horizontal. The regions of interest in the pattern are magnified in boxes. Taken from ref. 13.

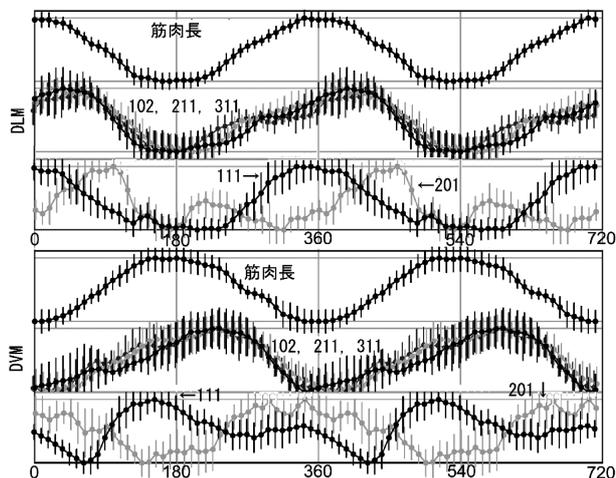


Fig. 12 Results of analysis of X-ray diffraction movies as shown in Fig. 11. The intensity changes and muscle length changes are plotted for 2 wing-beat cycles. The muscle length or the intensities of reflections are plotted for each muscle (DLM, above; DVM, below) against the phase of wing-beat in degrees, after normalizing with respect to their maximal amplitudes. Top row; muscle length (maximal amplitude $\sim 2\%$); middle row, 102 (black), 211 (dark gray) and 311 (light gray) reflections; bottom row, 111 (black) and 201 (gray) reflections. The error bars indicate SEM ($n=9$). Taken from ref. 13.

る）。またハチの羽ばたき頻度は約 120 Hz で、これは毎秒 5000 コマの撮影だと羽ばたき 1 回あたり 40 フレームに相当する。しかし羽ばたき頻度には個体差があり、また同じハチでも測定を繰り返すと羽ばたき頻度が低下してくる。そこで各個体からのムービーを羽ばたき 1 回あたり正確に 40 フレームになるよう強度を再分配してから加算を行

っている。こうして得られたムービーから得られる情報は非常に多

い (Fig. 12)。まず赤道反射から格子定数 (d -spacing) を求めることで、筋肉の長さ変化を推定することができる。これは筋肉のフィラメント格子がほぼ一定体積の物体として振舞うため、筋肉が伸ばされるとフィラメント間の距離が減少するためである。こうして推定された筋肉長さ変化はほぼ純粋に正弦波であり、DLM と DVM の長さ変化は完全に反位相 (位相差179.2度) であることが分かった。

またアクチン第1層線上の外側の反射である211, 311などのスポットはミオシンがアクチンに強く結合し、力を発生したときに増強する反射といわれている¹⁴⁾。これらの反射の増強の位相は筋肉長さ変化にやや遅れる。これはいわゆる「負の粘性」で (理想的な粘性物体の応力は長さ変化の速度、つまり微分に比例するため、長さ変化がサイン関数なら応力はコサインとなり、90度の位相進みになる)、「伸長による活性化」が起こっている証拠となる。

さて、問題の111反射, 201反射であるが、上記の211や311と異なり、筋肉が伸ばされるタイミングで111は増強し、201が相補的に減少している。これは先に述べた脱膜標本の結果と一致している。しかもこれらの反射強度の変化は顕著であり、かなり大きな質量の移動が単位胞の中で起こっていることを示唆する。トロポニンIの延長部が「伸長による活性化」に関与する可能性は先に述べたとおり否定されているが、仮にこの部分の移動だとしても分子量は30 kDa程度であり、しかも38.7 nmごとに2分子しか存在しない。これ以外に十分な分子量があり、単位胞内を移動できる物体はミオシン頭部しかない。これは1個あたり約100 kDa, 1分子あたり2個であり、ミオシン繊維には14.5 nmごとに4分子が存在する。

それでは質量がどのように移動したとき、111反射と201反射の相補的な強度変化が起こるのだろうか？ これを知るために行ったモデル計算の結果を Fig. 13 に示す。これは単位胞の断面で、そこに質量が存在したときに強度比が111 > 201になる領域と201 > 111になる領域を異なる色で示している。したがって異なる色の領域間を質量が移動すれば、観察された反射強度の相補的な変化が説明できる。Fig. 13 に示したとおり、これをトロポニンの移動で説明しようとする、非現実的な距離を移動させる必要がある。一方これがミオシン頭部の移動によるならば、無理のないミオシン頭部の移動によって強度変化が説明できる。

この本論文¹³⁾に記述したモデルは2次元での計算であるが、その後3次元に拡張したモデル計算も行っている (Iwamoto and Yagi, 未発表)。それによると、質量を長軸方向に約20 nm 移動させたときに最も効率的に相補的強度変化を起こすことができるが、これは筋肉長の約1.5%の伸長にあたり、最もよく「伸長による活性化」を起こすことのできる伸長量である。

またこれらの計算は軸方向の周期が38.7 nm の単位胞として計算しているため、質量は38.7 nm 周期で存在している必要がある。したがってこの質量がミオシン頭部である

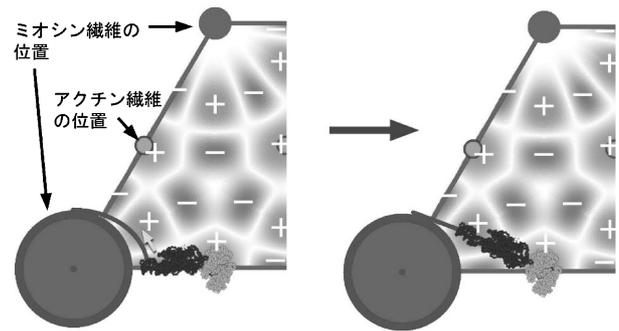


Fig. 13 Result of model calculation, showing the regions within the unit cell of the myofilament lattice, in which 111 is stronger than 201 (+) or vice versa (-) when a mass is present there. Taken from ref. 13.

なら、これはミオシン繊維上でミオシンのらせん配列に従った頭部ではなく、既に何らかの形でアクチン繊維のターゲットゾーンに結合したミオシン頭部ということになる。しかしアクチンに強く結合したミオシン頭部は、伸長してもアクチンとの相対的距離が変わらないため強度変化を説明できない。したがって強度変化を起こすのはターゲットゾーンに緩く (フレキシブルに) 結合したミオシン頭部と想像される。

以上から考えられる「伸長による活性化」の仕組みは次のとおりである。カルシウム存在下で、ミオシンはまずアクチンのターゲットゾーンにフレキシブルな形で結合する。このときミオシン頭部はまだ張力を発生していない。このとき筋細胞が伸長されると、このミオシン頭部が変形を受ける。この変形が引き金となり、ミオシンがアクチンに強く結合し張力が発生する。

この力を発生しないミオシン頭部が伸長により力発生型に転換するという機構は、実は脊椎動物骨格筋について以前に提唱したものである¹⁵⁾。骨格筋は疲労して細胞内にリン酸が蓄積すると張力が落ちてしまう。しかしこれを引っ張ると、非常に大きな力を出して引っ張りに抵抗する。リン酸は細胞のエネルギー源である ATP の分解産物で、これがあるとミオシン頭部の化学平衡が力発生型から力をまだ出していない中間体へと押し戻されると考えられる。この「力をまだ出していない中間体」が伸長によって力発生型に転換するというのがこの現象の説明である。そうすると、伸長によって力発生型に転換するのはミオシンの一般的な性質であって、昆虫もこの性質を利用することで高速羽ばたきの機構を発展させたということになる。

我々の心臓は、一度にどれだけの量の血液が流れ込もうとも、それを全て一度の拍出によって送り出さなければならない。そのため血液の流入によって心筋が伸ばされると、心筋は伸ばされた量に応じた力を出して血液を拍出する性質を持っている (フランク-スターリングの法則)。これに「伸長による活性化」が関わっていると考えられている。筆者らの考えが正しければ、昆虫の飛翔筋は我々自

身の筋肉の動きを理解するための実験モデルとして役立って行くであろう。

参考文献

- 1) O. Sotavalta: Biol. Bull. **104**, 439–444 (1953).
- 2) J. W. S. Pringle: Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **201**, 107–130 (1978).
- 3) K. E. Conley and S. L. Lindstedt: J. Exp. Biol. **205**, 2175–2181 (2002).
- 4) R. T. Tregear et al.: Biophys. J. **86**, 3009–3019 (2004).
- 5) J. S. Wray: Nature **280**, 325–326 (1979).
- 6) B. Agianian et al.: EMBO J. **23**, 772–779 (2004).
- 7) B. Bullard and A. Pastore: J. Muscle Res. Cell Motil. **32**, 303–313 (2011).
- 8) R. J. Perz-Edwards et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 120–125 (2011).
- 9) H. Iwamoto: Biochem. Biophys. Res. Commun. **431**, 47–51 (2013).
- 10) H. Iwamoto: J. Struct. Biol. **183**, 33–39 (2013).
- 11) J. D. Clayton et al.: J. Muscle Res. Cell Motil. **19**, 117–127 (1998).
- 12) H. Iwamoto and N. Yagi: Biophys. J. **100**, 11a–12a (2011).
- 13) H. Iwamoto and N. Yagi: Science **341**, 1243–1246 (2013).
- 14) R. T. Tregear et al.: Biophys. J. **74**, 1439–1451 (1998).
- 15) H. Iwamoto: Biophys. J. **68**, 243–250 (1995).

著者紹介



岩本裕之

(公財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 主幹研究員

E-mail: iwamoto@spring8.or.jp

専門：X線繊維回折

【略歴】

1984年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了（理学博士），1985年帝京大学医学部講師，1997より現職。



八木直人

(公財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 コーディネーター

E-mail: yagi@spring8.or.jp

専門：非結晶 X 線回折

【略歴】

1975年東京大学物理工学科卒業，1980年東北大学医学部助手，1982年医学博士，1990年東北大学医学部講師，1997年より高輝度光科学研究センター，2013年より現職。

Mechanism of high-frequency wing beat of insects as revealed by high-flux synchrotron radiation X-ray

Hiroyuki IWAMOTO Japan Synchrotron Radiation Research Institute, SPring-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan

Naoto YAGI Japan Synchrotron Radiation Research Institute, SPring-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan

Abstract This review article describes the results and implications of the study that pursued the mechanism of action of flight muscle of insects, whose wing-beat frequencies can reach 1,000 Hz in some species, by using high-flux synchrotron radiation X-ray beams generated by SPring-8.